

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

第2619866号

(45) 発行日 平成9年(1997)6月11日

(24) 登録日 平成9年(1997)3月11日

(51) Int. CL <sup>4</sup>	識別記号	序内整理番号	P I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68		7823-4B	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 N 15/00			G 0 1 N 33/50	P
G 0 1 N 33/50		9282-4B	C 1 2 N 15/00	Z

発明の数4(全 24 頁)

(21) 出願番号 特願昭62-3905

(22) 出願日 昭和62年(1987)1月10日

(65) 公開番号 特開昭62-244399

(43) 公開日 昭和62年(1987)10月24日

(31) 優先権主張番号 8 1 7 8 4 1

(32) 優先日 1986年1月10日

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(73) 特許権者 999999999

アモコ・コーポレーション

アメリカ合衆国イリノイ州60601, シカ  
ゴ市イースト・ランドルフ・ドライブ  
200

(72) 発明者 ラリー・エドワード・モリソン

アメリカ合衆国イリノイ州60532, ライ  
スル, スペンサー 4913

(74) 代理人 弁理士 湯浅 義三 (外4名)

審査官 村上 晴見高

(54) 【発明の名称】 競合的均質検定法

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】 標的ポリヌクレオチドについて試料を検定する方法であって、

(a) 試料と試薬を結合条件下で接触させ、

ここで上記試薬は第1ポリヌクレオチドプローブおよび第2ポリヌクレオチドプローブを含み、上記第1および第2ポリヌクレオチドプローブはそれらが互いに結合する第1の位置をとることができ且つ上記プローブの少なくとも1つは上記プローブ鎖が上記標的ポリヌクレオチドと結合する第2の位置をとることができ、上記第1プローブおよび第2プローブはこれらのプローブの一方と会合した第1標識成分を含みおよび他方のプローブと会合した第2標識成分を含み、上記第1および第2標識成分は上記第1および第2プローブが互いに結合するとき相互作用して上記2つの位置の一方にあるプローブに特

2

徴的な検出しうる信号を発することができる；および

(b) 上記試料中の標的の存在と関連がある信号の存在について上記試料を監視する；

の各工程を含む方法。

【請求項2】 第1標識成分は上記プローブの一方の3'末端に存在し、第2標識成分は他方のプローブの5'末端に存在する。特許請求の範囲第1項記載の方法。

【請求項3】 各プローブは複数の標識成分を有する。特許請求の範囲第1項記載の方法。

10 【請求項4】 上記標識成分はそれぞれ上記プローブの末端に存在する。特許請求の範囲第3項記載の方法。

【請求項5】 第1標識成分は上記プローブの一方の3'末端に存在し、第2標識成分は他方のプローブの5'末端に存在する。特許請求の範囲第3項記載の方法。

【請求項6】 第1標識成分は核酸のアミノアルキル誘導

(2)

特許2619866

3

体により上記プローブと会合している。特許請求の範囲第2項記載の方法。

【請求項7】上記誘導体はアデニンのアミノアルキル誘導体を含む、特許請求の範囲第6項記載の方法。

【請求項8】上記誘導体はアデニンのアミノヘキシル誘導体を含む、特許請求の範囲第6項記載の方法。

【請求項9】上記誘導体は8-(6-アミノヘキシル)-アミノアデノシン-5'-モノホスフェートを含む、特許請求の範囲第6項記載の方法。

【請求項10】3'末端にある上記標識成分は核酸の蛍光性誘導体である、特許請求の範囲第5項記載の方法。

【請求項11】標識成分は1-N-エチノアデノシン-5'-モノホスフェートの誘導体を含む、特許請求の範囲第10項記載の方法。

【請求項12】標的ポリヌクレオチドについて試料を検定するための試薬を含むキットであって、上記試薬は第1ポリヌクレオチドプローブおよび第2ポリヌクレオチドプローブを含み、上記第1および第2プローブはそれらが互いに結合する第1の位置をとることができ且つ上記プローブの少なくとも1つは上記プローブ鎖が上記標的と結合する第2の位置をとることができ、上記第1プローブおよび第2プローブはこれらのプローブの一方と会合した第1標識成分および他方のプローブと会合した第2標識成分を含み、上記第1および第2標識成分は上記第1および第2プローブが互いに結合するとき相互作用して、上記2つの位置の一方にあるプローブに特徴的な検出しうる信号を発することができることを特徴とするキット。

【請求項13】第1標識成分は上記プローブの一方の3'末端に存在し、第2標識成分は他方のプローブの5'末端に存在する、特許請求の範囲第12項記載のキット。

【請求項14】各プローブは複数の標識成分を有する、特許請求の範囲第13項記載のキット。

【請求項15】上記標識成分はそれぞれ上記プローブの末端に存在する、特許請求の範囲第14項記載のキット。

【請求項16】第1標識成分は3'末端に存在し、第2標識成分は5'末端に存在する、特許請求の範囲第14項記載のキット。

【請求項17】試料中のポリヌクレオチド標的について競合的均質検定を行うための装置であって、試薬および試料を取容するのに適した容器手段、ここで上記試薬は第1プローブおよび第2プローブを含み、上記第1および第2プローブは第1プローブが第2プローブと結合する第1の位置およびこれらのプローブの少なくとも1つが上記標的と結合する第2の位置をとることができ、上記プローブは一方のプローブと会合した少なくとも1つの標識成分および他方のプローブと会合した第2標識成分を有し、上記第1および第2標識成分は上記プローブが上記第1の位置にあるとき相互作用して、

4

上記標識成分の一方の励起の際に上記位置の一方に特徴的な検出しうる信号を発することができる；

上記標識成分の一方を励起する手段；および

上記信号を検出する手段；

を含む装置。

【請求項18】標識成分は蛍光団であり、標識成分の一方を励起する手段が光源を含む、特許請求の範囲第17項記載の装置。

【請求項19】少なくとも1つの標識成分が化学発光剤であり、標識成分の一方を励起する手段が上記容器に化学発光補助因子を導入する手段を含む、特許請求の範囲第17項記載の装置。

【請求項20】検出手段が光検出器を含む、特許請求の範囲第17項記載の装置。

【請求項21】標的ポリヌクレオチドについて試料を検定するためのキットであって、ポリヌクレオチドプローブの少なくとも一方の末端を介して結合している標識成分を有する少なくとも1つのポリヌクレオチドプローブを含み、標識成分は、ポリヌクレオチドプローブと相補的なポリヌクレオチドセグメントの末端に結合した第2標識成分と相互作用することができることを特徴とするキット。

【請求項22】ポリヌクレオチドプローブが、ポリヌクレオチドプローブの3'末端および5'末端のそれぞれに結合した標識成分を有する、請求項21記載のキット。

【請求項23】標識成分が第1および第2の蛍光団を含む、請求項21記載のキット。

【発明の詳細な説明】

産業上の利用分野

本発明は標的分子の検出および定量分析において有用な方法、試薬、組成物、キットおよび器具に関する。特に本発明はデオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)のハイブリダイゼーション検定を行うための方法、試薬、組成物およびキットに関する。

従来技術

本発明は係属中の米国特許出願第738560号(1985年5月28日付)および同第284459号(1981年7月21日付)の一部継続出願であり、これらはここに参照により引用される。

次の定義は本発明の理解を促すために与えられる。本明細書で用いる“生物学的結合対”という用語は、相互補和性または結合能を示す分子対を意味する。“リガンド”という用語は、本明細書において、生物学的結合対の一方の分子を意味し、そして“抗リガンド”または“受容体”は生物学的結合対の他方の分子を意味するだろう。例えば、限定するものではないが、本発明の実施態様は生物学的結合対が2つの相補的なポリ核酸鎖を含む核酸ハイブリダイゼーション検定に適用される。これらの核酸鎖の一方がリガンドと呼ばれ、他方が抗リガンドと呼ばれる。しかしながら、生物学的結合対は2,3の名

(3)

特許2619866

5

を挙げるならば、抗原および抗体、薬物および薬物受容部位、ならびに酵素および酵素基質を含む。

“プローブ”という用語は標的リガンドと選択的に結合できる既知性状のリガンドを意味する。核酸に適用するとき、“プローブ”は標的核酸鎖に相補的な塩基配列を有する核酸鎖を意味する。

“標識”という用語は例えば放射性同位体；酵素；発光剤または蛍光剤；および色素を含む検出可能な分子成分を意味する。“剤”という用語は検出可能な応答へ導く反応に関与する全ての分子成分を含めた広い意味で使用される。“補助因子”という用語はその剤との反応に関与する全ての分子成分を含めた広い意味で使用される。

遺伝情報は生細胞中に存在する糸状のDNA分子に蓄えられている。in vivoにおいてDNA分子は二重らせんであり、二重らせんの各鎖はヌクレオチド鎖である。各ヌクレオチドは4種類の塩基：アデニン（A）、グアニン（G）、チミン（T）およびシトシン（C）の一つによつて特徴づけられる。塩基は官能基の向きにより一定の塩基対が互いに引きつけ合つて水素結合により結合するという意味で相補的である。一方のDNA鎖のアデニンは他方の相補鎖のチミンと対合する。一方のDNA鎖のグアニンは他方の相補鎖のシトシンと対合する。RNAでは、チミン塩基がウラシル（U）で置き換えられ、ウラシルは相補鎖中のアデニンと対合する。

生物の遺伝暗号は塩基対配列のDNA鎖により伝達される。DNAは共有結合されたデオキシリボヌクレオチド鎖から成り、RNAは共有結合されたリボヌクレオチド鎖から成る。それぞれの核酸は1つのヌクレオチドの糖の5'-ヒドロキシル基と隣接ヌクレオチドの糖の3'-ヒドロキシル基との間のホスホジエステル結合によつて結合される。自然界に存在するDNAまたはRNAの各鎖状鎖は、遊離5'-ヒドロキシル基をもつ末端と遊離3'-ヒドロキシル基をもつ末端とを有する。ポリヌクレオチドの各末端はそれぞれの遊離ヒドロキシル基に関連づけてしばしば5'末端または3'末端と呼ばれている。自然界に存在するポリヌクレオチドはその5'末端にホスフェート基をもち得る。DNAおよびRNAの相補鎖は、一方の鎖の3'末端が他方の鎖の5'末端と結合する逆平行複合体を形成する。

核酸ハイブリダイゼーション検定は2本の核酸鎖がそれらの相補領域で対合する傾向に基づいている。現在、核酸ハイブリダイゼーション検定は主に完全なDNA分子中の、または核酸混合物中の、または核酸フラグメント混合物中の、特異なDNAもしくはRNA塩基配列あるいは特定遺伝子を検出して同定するために使用されている。

組織または培養物試料から抽出された全DNAまたはRNA中の特異なDNAまたはRNA配列もしくは特定遺伝子の同定は、生理学的または病理学的症状の存在を示すかも知れない。特に、ヒトまたは動物組織から抽出された全DNA

6

またはRNA中の特異なDNAまたはRNA配列もしくは特定遺伝子の同定は鎌状赤血球貧血、組織適合性、癌および前癌状態、または細菌やウイルス感染などの症状もしくはは遺伝病の存在を示唆する。細菌培養物から抽出された全DNAまたはRNA中の特異なDNAまたはRNA配列もしくは特定遺伝子の同定は抗生物質耐性、毒物、ウイルスまたはプラスミドに関連した状態の存在を示し、また細菌型の同定を可能にする。

従つて、核酸ハイブリダイゼーション検定は病気の診断および検出において大きな可能性を有している。さらに、その可能性は植物の病因や毒物産生菌を検出するために核酸ハイブリダイゼーション検定を使用する農業や食品加工の分野にも存在する。

最も広く使用されているポリヌクレオチドハイブリダイゼーション検定法の1つは、サザンブロットフィルターハイブリダイゼーション法または単にサザン法として知られているものである（Southern, E., J. Mol. Biol., 98, 503, 1975を参照）。サザン法は標的DNAまたはRNA配列を同定するために用いられる。この方法は一般に対象となる標的配列を保有する可能性がある生物から単離したRNAまたはDNA試料を制限エンドヌクレアーゼで消化して、DNAフラグメントを形成することによつて実施される。その後、DNAフラグメント試料はアガロースやポリアクリルアミドのようなゲルで電気泳動を行い、フラグメント試料を鎖長により分類する。各フラグメント群は標的配列の存在について試験される。DNAをニトロセルロースシートへ移行させるためにゲル内部で変性する。DNAフラグメント試料を含むゲルはニトロセルロースフィルターシートまたはシアノ化紙（これにDNAフラグメントが移行して結合または固定される）と接触させる。次いで、DNAフラグメント試料を含むニトロセルロースシートを約85℃に加熱してDNAを固定する。その後ニトロセルロースシートを変性した（一本鎖の）放射性標識DNAプローブを含む溶液で処理する。放射性標識プローブは標的配列に相補的な塩基配列と検出可能な放射性成分を有するDNA鎖を含む。

プローブとDNAフラグメントとのハイブリダイゼーションを行わせる。ハイブリダイゼーション工程の間に固定化DNA試料と標識DNAプローブとを結合させて、再び二本鎖構造を形成させる。

ハイブリダイゼーション法はきわめて特異的である。標識プローブはもしも2つのDNA鎖が実質的に相補的な塩基対機構を共有しないならばDNA試料と結合しないであろう。ハイブリダイゼーションは所定の条件に応じて3〜48時間を要する。

続いてハイブリダイズしなかつたプローブを洗い落とす。次に、ニトロセルロースシートをX線フィルムのシート上にのせて感光させる。X線フィルムは感光面を現像して、DNAプローブとハイブリダイズしたDNAフラグメント（従つて対象とする塩基対配列を含む）を同定す

(4)

特許2619866

7

る。

核酸ハイブリダイゼーション検定の使用は、X線フィルム上にバンドを視覚化するための長い感光時間によって幾分か妨げられている。一般的なサザン法は感光のために1〜7日間を要する。さらに、この技法の多くは標識剤として放射性同位体を必要とする。放射性標識剤を使用するには特別の実験手段とライセンスが必要である。

放射線標識を使用する検定法に關係した上記の諸問題は、発光分子のような非放射性標識を使用する免疫検定法の開発へと導いた。一般的にはスミス (Smith) らの *Ann. Clin. Biochem.* 18:253-74 (1981) を参照されたい。発光標識は外部エネルギー源によつて励起された際に光を発生し、励起エネルギー源の種類に応じて、例えば高エネルギー粒子からエネルギーを誘発する放射性発光標識；化学反応からエネルギーを得る化学発光標識；励起エネルギーが生物学的系に供給される生物発光標識；および赤外線、可視光線または紫外線の電磁線（光子、フォトン）の単位によつて励起される光ルミネッセンスまたは蛍光標識；に分類される。上記文献の255頁を参照されたい。

非放射性エネルギー源によつて励起される標識を使用する発光検定法は、放射性標識を使用する検定法に伴う健康上の危険性やライセンスの問題を回避することができる。さらに、発光標識の使用は、標識プローブが検定試薬と結合したときに結合しなかつたときとは異なる発光特性を示し、その結果結合した標識プローブと結合しなかつた標識プローブとを分離する必要がないという点で「均質な」検定法の開発を可能にする。沈殿、酵素、発光標識成分を使用する非放射性核酸型検定は信頼できるとみなすに足る感度または特異性を与えていない。

発光検定法では、生物学的試料中のタンパク質や他の分子の存在が励起光線の散乱（「レイリー散乱」）を引き起こし、その結果励起光線の波長の約50nm以内の波長で光を発する発光標識との干渉が生じる。内因性の化合物はまた散乱分子に特徴的な比較的長い波長で励起光線を散乱させ（「ラマン散乱」）、また発光標識の発光スペクトル中の光線を吸収し、その結果発光プローブの消光をもたらす。

不均質な発光検定法の感度を改善する試みはいわゆる「時間分解 (time resolved)」検定法の開発へと導いた。ソニ (Soni) らの *Clin. Chem.* 29:1, 65-68 (1983)；米国特許第4176097号を参照されたい。時間分解検定法は一般に試料中に存在する物質の自然蛍光の発光寿命1〜20nsecとは著しく異なる（通常はより長い）発光寿命をもつ発光標識を使用することを含む。検定の結合工程を行い、分離された結合標識物質または非結合標識物質をキセノン放電管または他のパルス化エネルギー源から発生する一連のエネルギーパルスにより励起する。各パルスから生じる標識の発光は、試料中のバックグラウン

8

ド物質の自然蛍光の寿命よりも長い時間で測定する。こうしてバックグラウンド散乱および短命の試料蛍光からの干渉が測定発光から排除される。

プローブまたは試料DNAの分離や固定化を必要とするこの技法は非放射性検定の操作を煩雑にしている。発光標識成分の発光は固体支持体によつて低下される。支持物質はバックグラウンド蛍光源であり得、また発生光線を反射もしくは散乱させて検定を妨害する。ハイブリダイゼーション工程に要する時間は、相補的DNA鎖が相補的対合關係にあるDNA鎖対の一方の固定化により完全に遊離状態でない場合に増大する。標識プローブの固体支持体への非特異的結合も検定の精度を低下させる。

発明の要約

本発明の目的は、対象とする標的ポリヌクレオチド鎖の検定を行うための方法、試薬、組成物、キットおよび器具を提供することである。その他の目的は以後に示すであろう。

要約すると、本発明の実施態様は生物学的結合対の構成員である標的分子について試料を検定する方法を包含する。本方法は試料とプローブ（プローブリガンドおよびプローブ抗リガンドを含む）含有試薬とを結合条件下で接触させることを含む。プローブリガンドおよびプローブ抗リガンドは互いに対して第1の結合位置をとることができ、プローブ構成員の少なくとも一方は標的分子に対して第2の結合位置をとることができる。プローブ構成員はプローブリガンド上に位置する第1標識成分およびプローブ抗リガンド上に位置する第2標識成分を含む。第1および第2標識成分はプローブリガンドおよび抗リガンドが第1結合位置で存在するとき相互作用し、2つの位置の一方にある試薬リガンドおよび抗リガンドに特徴的な検出しうる信号を発することができる。試料は標的分子の存在と関連した信号の存在について監視される。

本発明の実施態様はさらに標的ポリヌクレオチド鎖について試料を検定する方法を包含する。本方法は試料と試薬（第1ポリヌクレオチドプローブおよび第2ポリヌクレオチドプローブを含む）とを結合条件下で接触させることを含む。第1および第2プローブはプローブ同士が互いに結合する位置をとることができ、プローブの少なくとも一方はそのプローブが標的ポリヌクレオチド鎖と結合する第2位置をとることができる。第1および第2プローブは一方のプローブに位置する第1標識成分および他方のプローブに位置する第2標識成分を含む。第1および第2標識成分は第1および第2プローブが互いに結合したとき相互作用して、2つの位置の一方にある試薬鎖に特徴的な検出しうる信号を発することができる。試薬と接触させた試料は、試料中に標的ポリヌクレオチド鎖が存在することと関連する信号の存在について監視する。本方法は固定化工程を必要とせず、また放射性標識技術を使用せずにポリヌクレオチド試料を検定

(5)

特許2619866

9

10

することができる。

好ましくは、少なくとも1つの標識成分は一方のプロープの3'末端に存在し、そして第2標識成分は他方のプロープの5'末端に存在する。各プロープに対して複数の標識成分を使用することができ、好ましくは2つの標識成分(各末端に1つずつ)を使用する。例えば、第1標識成分は3'位置で第1プロープと結合し、第2標識成分は5'位置で結合する。類似の標識成分の構成(すなわち3'位置に第1標識成分および5'位置に第2標識成分)をもつ第2プロープは、相対するプロープの第1および第2標識成分がきわめて接近して相互作用することができるように、第1プロープとハイブリダイズするであろう。

本発明方法の実施態様は、増幅手段中に標的配列と実質的に同一の塩基配列を有するポリヌクレオチドセグメントをスプライシングして、試薬ポリヌクレオチドセグメントの多数のコピーを形成させることによる追加のプロープ作製工程を含む。好適には、増幅手段は細菌中に組み込んだときに増殖する高いコピー数のプラスミドまたはファージである。標的配列と実質的に同一の塩基配列を有するポリヌクレオチドセグメントは細胞成分、および望ましくない細菌、プラスミドまたはファージDNAから分離し、制限消化してセグメントとなる。その後、セグメントは標識成分を付加してプロープを作製するために利用される。

さらに、各プラスミドまたはファージ誘導セクションは制限酵素で消化して、標識成分を一まとめにして結合できる多数のサブセクションとする。各サブセクションは標的鎖の代表的部分とハイブリダイズすることができるであろう。プラスミドまたはファージ由来の多数の試薬プロープはより優れた信号発生能をもたらす、効率よくかつ比較的安価にプロープを提供するであろう。

本発明の実施態様はさらに、DNA鎖の3'末端を非放射的標識するための方法およびその結果得られる組成物を包含する。その組成物は核酸のアミノアルキル誘導体を有するDNA鎖を含む。核酸のアミノ基はアミン反応性標識成分と反応することができる。好ましくは、そのアミノアルキル誘導体は脂肪族の第1アミノ基を含む。より詳細には、好適なアミノアルキル誘導体は酵素ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(TdT)によつて試薬鎖に結合し得るアミノヘキシルアミノアデノシン三リン酸のようなリボ核酸誘導体を含む。

ターミナルトランスフェラーゼは一本鎖DNAの末端に1つまたは2つのリボ核酸誘導体を付加して、それにより信号強度を標準化するために大きさによつて分類しなければならず且つ立体効果に寄与するデオキシ誘導体の尾部に本発明が備わっている諸問題を取り除くであろう。尾部上の標識はエネルギー転移のための適当な立体関係または衝突の相互作用をもちよまたない。しかしながら、尾部は尾部上の標識成分が「サイレント(silent

」である場合に良好であり、例えば多くの消光剤は消光剤のより大きな局部濃度ゆえにより大きな消光活性をもたらす、しかも消光剤が非蛍光性である場合には増大したバックグラウンドを示さない。

本発明の実施態様はさらに、生物学的結合対の一部である標的分子の検定を行うためのキットを包含する。標的分子が特定の塩基配列を有する核酸のセグメントである場合に、キットは第1ポリヌクレオチドプロープおよび第2ポリヌクレオチドプロープを含む試薬を包含する。第1および第2プロープはそれらが結合条件下で互いに結合する第1の位置をとることができ、これらのプロープの少なくとも一方はそのプロープが標的と結合する第2の位置をとることができる。第1および第2プロープは一方のプロープと結合した少なくとも1つの標識成分および他方のプロープと結合した第2標識成分を有する。第1および第2標識成分は第1および第2プロープが第1位置にあるとき相互作用して、2つの位置の一方にあるプロープに特徴的な検出しうる信号を発することができる。

本発明の実施態様はさらに、本方法に従つて検定を行うための器具を包含する。標的がポリヌクレオチドセグメントである場合、その器具は試薬と標的を実質的に混合した均質状態で収容するのに適した反応室を含む。試薬は第1ポリヌクレオチドプロープおよび第2ポリヌクレオチドプロープを含有する。第1および第2プロープはそれらが結合条件下で互いに結合する第1の位置をとることができ、これらのプロープの少なくとも一方はそのプロープが標的と結合する第2の位置をとることができる。第1および第2プロープはこれらのプロープの一方と結合した少なくとも1つの標識成分および他方のプロープと結合した第2標識成分を有する。第1および第2標識成分は第1および第2プロープが第1位置にあるとき相互作用して、2つの位置の一方に特徴的な検出しうる信号を発することができる。器具はさらに信号を検出するための適当な検出手段(例えば発光剤の場合には光電増倍管)を含む。

蛍光検定において使用するのに適した本器具の態様は適当な標識励起手段(適切な波長を定めるフィルターを備えたレーザーまたは光-放射装置、または化学発光剤や酵素剤の場合には補助因子を注入するための注入装置など)を含む。

好適な器具は光を反応室へパルス化し、エネルギー転移により生じた蛍光の放出を選択的に読み取つてバックグラウンド蛍光を減らすための時間分解制御(time resolved control)を含むであろう。

好適な実施態様の説明

今や本発明の好適な態様を模式図によつて示す図面を参照すると、特に第1図では、必要な試薬組成物と共に、標的ポリヌクレオチド鎖の検定方法が模式的に示されている。慣用の検定法において、1つ以上の標的鎖お

(6)

特許2619866

11

および1つ以上のプローブ鎖を用いて検定が行われる。しかしながら、単純化して本発明をより理解しやすくするために、図面では単一の試薬セグメントと単一の標的セグメントのみを示す。

第1図はハイブリダイズした又は相互に結合した第1位置にある第1および第2ポリヌクレオチド鎖プローブ（それぞれP1およびP2）を示す。また、対象とする2つの相補的な標的鎖から成る二本鎖DNA（それぞれT1およびT2）を示す。第1プローブ（P1）は各末端に2つの標識成分（A1およびM1）を含む。第1標識成分（A1）は第1プローブ（P1）の5'末端に共有結合されており、そして第2標識成分（M1）は第1プローブの3'末端に共有結合されている。同様に、別の第1標識成分（A2）が第2プローブ（P2）の5'末端に共有結合されており、そして別の第2標識成分（M2）が第2プローブの3'末端に共有結合されている。相対するプローブの第1および第2標識成分（A1とD2）および（A2とM1）は第1および第2プローブが相互に結合した第1の位置にあるとき相互作用することができる。

当分野で通常の知識を有する者は、標識成分が共有結合以外の方法、例えば限定するものではないが挿入（intercalation）、キレート化、およびイオニック、親水的または疎水的親和性によりDNAプローブと結合または会合しうることを認めるであろう。本明細書で使用する“会合”という用語は標識成分をプローブに結合させる全ての手段を包含する。

本発明の標識成分はそれらを相互作用させる方法で対合または集合される。例えば、限定するものではないが、標識鎖は第1および第2蛍光団を含む標識成分の組合せ、蛍光団および化学発光成分の組合せ、化学発光成分および補助因子の組合せ、沈殿剤および可溶化剤の組合せ、酵素および基質の組合せ、ならびに比色定数成分および補助因子の組合せであり得る。

第1図において、第1標識成分は特定波長（ $h\nu_1$ ）のエネルギーまたは光を受信し且つ第2波長（ $h\nu_2$ ）でエネルギーまたは光を発信し得る蛍光団（A1およびA2）である。同様に、第2標識成分は特定波長（ $h\nu_3$ ）のエネルギーまたは光を受信し且つ第2波長（ $h\nu_4$ ）でエネルギーを発信もしくは乾移し得る蛍光団（M1およびM2）である。相対するプローブの第1および第2蛍光団（A1とD2）および（A2とM1）は、第1および第2プローブが相互に結合した第1の位置にあるとき相互作用することができる。こうして第2蛍光団から放射される光は消去される。さらに、通常第1蛍光団（A1およびA2）が受信できない波長 $h\nu_3$ の光は相互作用により波長 $h\nu_4$ の発光をもたらす。

第1図に示すように、プローブ（P1およびP2）は標的鎖（T1およびT2）に加えるかまたは組み合わされる。プローブおよび標的鎖は変性して分離させる。次に、プローブと標的をハイブリダイズさせ、さらにプローブが標

12

的と結合してプローブ-標的ハイブリッド（PT1およびPT2）を形成する第2位置へ結合させる。各プローブ鎖の標識成分は相対するプローブ鎖の標識成分から分離されて相互作用することができない。

プローブ鎖（P1およびP2）が相互に結合した第1の位置では、第2蛍光団（M1およびM2）を励起するのに適した波長（ $h\nu_3$ ）の光エネルギーの放射が、初期励起波長（ $h\nu_3$ ）または第2蛍光団（M1およびM2）の通常の放出波長（ $h\nu_4$ ）とは異なる波長（ $h\nu_2$ ）の光エネルギーを第1蛍光団（A1およびA2）から放出させる。プローブ（P1およびP2）と標的（T1およびT2）との第2位置へのハイブリダイゼーションは、相対するプローブ鎖（A1とD2; およびA2とM1）の標識成分同士の相互作用の分裂をもたらす。そして第1蛍光団（A1およびA2）の放出波長（ $h\nu_1$ ）での光の放出を減少させる。第1標識成分、すなわち蛍光団（A1およびA2）の放出波長（ $h\nu_1$ ）の光の放出減少は存在する標的の濃度と逆の関係にある。

第2蛍光団（M1およびM2）の発光は通常第1蛍光団（A1およびA2）の存在下で消滅され、その結果放出波長（ $h\nu_4$ ）の光エネルギーはほとんど放出されないか又は全く放出されない。しかしながら、プローブ鎖（P1およびP2）と標的鎖（T1およびT2）がハイブリダイズしてプローブ-標的ハイブリッド（PT1およびPT2）を形成すると、相対するプローブ鎖（A1とD2; およびA2とM1）の標識成分同士の相互作用がこわされて、第2蛍光団（M1およびM2）から波長（ $h\nu_4$ ）の検出可能な光エネルギーが放出され、これは標的（T1およびT2）と結合した第2位置をとるプローブ（P1およびP2）に特徴的である。第2標識成分、すなわち蛍光団（M1およびM2）、の放出波長（ $h\nu_4$ ）の光の放出増加は標的鎖の濃度と関係がある。

2つの波長（ $h\nu_1$ ）および（ $h\nu_2$ ）での第1および第2標識成分、すなわち蛍光団（A1とA2; およびM1とM2）の発光値は分析的に組み合わせられていずれか一方の値のみよりも優れた感度および精度の標的鎖の濃度に関する合計値を与えることができる。どちらの信号も標的鎖（T1およびT2）の存在について監視される。

第1および第2蛍光団の選択、光散乱、二次蛍光、および光を蛍光団に放射する励起装置または発光装置の制限により、多重信号特にプローブ（P1およびP2）が互いに結合した位置にあるときの第1蛍光団（A1およびA2）の信号を検出することは難しいかも知れない。さらに、光放出波長（ $h\nu_4$ ）は第2蛍光団（M1およびM2）の相互作用により必ずしも第1蛍光団（A1およびA2）の通常の放出波長ではない。光放出（ $h\nu_3$ ）は第1蛍光団（A1およびA2）または第2蛍光団（M1およびM2）単独とは全く異なる組合せもしくは群としての標識成分に特徴的であり、あるいは消光されるかも知れない。

変性および再アニーリング後に、相対するプローブの標識成分、すなわち第1および第2蛍光団（AおよびD）は分離され、そして標的-プローブハイブリッド

(7)

特許2619866

13

(PT1およびPT2)の形成により離れた状態にある。標的プローブハイブリッド(P1およびP2)の形成は、第1標識成分の蛍光団(A1およびA2)が第2蛍光団(D1およびD2)からのエネルギーを受け入れる又は消す能力を破壊する。エネルギーを受け入れる第1蛍光団へエネルギーを送る第2蛍光団(D1およびD2)の信号発生能は、一般に検出するのが比較的簡単である。第2蛍光団(D1およびD2)の信号強度の増加は試料中の標的の濃度および存在を示す尺度である。特定試料中の標的の量が多くなればなるほど、第2蛍光団の放出波長( $h\nu_2$ )の信号強度は大きくなる。

本方法は第2図に示す装置を用いて実施される。この装置は次の主な手段：すなわち励起手段または光源、収納容器およびフオトンカウンター(PC)の形の信号検出器を含む。

収納容器は標的ポリヌクレオチドを含む可能性がある試料と試薬を収容するのに適している。必要ならば、試料は当分野で知られた適当な標的捕獲/放出技法により標的ポリヌクレオチド以外の全ての細胞成分を除くために処理される。試料中のタンパク質系物質を溶解するためにはカオトロピック塩が使用される。

試料は第1プローブおよび第2プローブを含む試薬と混合される。第1および第2プローブはこれらのプローブが互いに結合する第1の位置、およびこれらのプローブの少なくとも一方が標的と結合しうる第2の位置をとることができる。各プローブはそれと会合した第1および第2標識成分(例えば蛍光団)を含み、第1および第2標識成分はプローブが互いに結合した第1位置にあるとき相互作用する。試薬はハイブリダイゼーションを促進する当分野で知られた促進剤を含んでいてもよい。

自動分析用に設計された器具において、第2図に示す装置は好ましくは複数の収納容器を収めるための手段を含むであろう。試料を含む収納容器は順次分析される。試料の精製、加熱、混合および再アニーリングは標識信号が測定されるステーションから離れたステーションで行うのが好ましい。従つて、収納容器は試料の精製、加熱および混合を行う第1ステーションまたは一連のステーションから、プローブおよび標的(存在するならば)を再アニーリングさせる第2ステーションへ運ばれる。その後、収納容器は標識信号を監視する第3ステーションへ送られる。

運搬手段は回転可能なターンテーブル、コンベヤーベルトまたは他の手段を含む。病院の臨床設定においては、運搬手段は手動による移動を含む。従つて、病院の医員は患者から組織試料を採取し、その試料を収納容器の中に入れることができる。試料の精製、加熱および試薬の混合はベッドサイドで開始され、そして収納容器を信号監視用の第3ステーションに移しながら継続されるだろう。

今や第1ステーションを参照すると、試料とプローブ

14

を融解温度に加熱するための加熱手段が収納容器にきわめて接近して配置されている。標的およびプローブはプローブ同士が互いに結合する第1の位置、または標的が存在する場合に少なくとも1つのプローブがその後の冷却の際に標的と結合する第2の位置のいずれかをとることができる。加熱手段は化学熱源、電気熱源または当分野で知られた他の熱源を含めた多くの形をとることができる。収納容器は試料とプローブの混合を促すために攪拌手段を含む。

第1ステーションから、プローブと標的(もし存在するならば)を再アニーリングさせる第2ステーションへ収納容器を運ぶ。融解または変性温度からの収納容器の冷却を促進するために、第2ステーションは冷却手段を含む。冷却手段はもしも十分な時間が許されるならば必要でなく、プローブと標的を再アニーリングさせるためには周囲温度でも十分に低い。

第2ステーションを去つて、収納容器は信号(2つの位置の一方をとるプローブに特徴的である)を監視する第3ステーションへ送られる。

第3ステーションは標識成分の1つを励起する手段を含む。第1および第2標識成分が蛍光団であるこの例では、励起手段は第2蛍光団の真質的励起を生じさせないように適当なフィルターを備えた光源を含む。また、適当に狭い発光スペクトルをもつレーザーも使用し得る。

標識成分の1つが化学発光剤を含む場合、その励起手段は発光反応を生じさせるための適当な補助因子を収納容器の中に注入する手段を含むであろう。

第3の作業ステーションは収納容器からの蛍光を受け取るべく配置された信号検出器、フオトンカウンター(PC)を含む。好ましくは2つのフオトンカウンター(PC)を使用する。1つのフオトンカウンターは第1標識成分から発せられる信号を受信し、そして第2のフオトンカウンターはフィルターまたは時間分解法の使用により第2標識成分から発せられる信号を受信する。

フオトンカウンターはアナライザーによつて受信され、増幅され、処理されるフオトン信号を発する。アナライザーはその結果をオペレーターに送る他の装置に表示させるように、フオトン信号を処理して図式的に示すことができる値に変える。

本装置はパルス化光源またはシヌソイド変調光源と共にアナログデフエクターを使用することにより、寿命分解法に適合させることができる。寿命分解法は本発明者の係属中の米国特許出願第738560号(1985年5月28日付)に説明されており、これは参照によりここに引用される。

本発明は合成オリゴヌクレオチドと共に使用するのに都合がよい。しかしながら、本発明は経済的な方法でプローブ(P1およびP2)を作製する生物学的クローニング法に容易に適合させることができる。

今や第3図を参照すると、標的配列に相補的であるこ



(8)

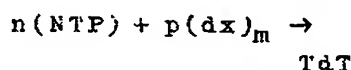
特許2619866

15

とが知られている塩基配列を含むDNAの二本鎖セグメント（以後プローブセグメントと呼ぶ）が適当組換えDNA法によりプラスミドの中へ導入される。例えば、プラスミドはプラスミド環を開裂して一本鎖の突出部または接着末端を生じさせる制限エンドヌクレアーゼで消化する。その接着末端はプローブセグメントの接着末端に相補的であつて、それと結合する。プローブセグメントはその後のクローンの同定のための選択マーカーと共に挿入される。

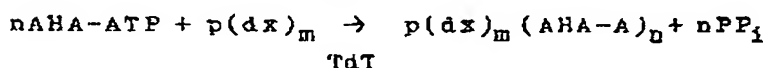
プラスミドはその後プラスミドが複製または増幅される大腸菌（*Escherichia coli*）のような細菌の中へ挿入される。細菌はプローブセグメントと選択マーカーを首尾よく組み込んだ細菌以外の細菌に対して有害である培地上でコロニーへと増殖させる。

細菌コロニーを増殖させてプラスミドを高コピー数へと複製させた後、細菌DNAおよびプラスミドDNAは他の細胞成分から分離し、そのDNAを制限酵素で消化してプラスミドDNAからプローブセグメントを切断する。次いで、プローブセグメントは電気泳動を含めた適当な手段で単離する。そのプローブセグメントは末端標識化してプローブを作製するのに適しているか、あるいはプローブとして価値があるサブセクションから成っている。従つて、大きいプローブセグメントは制限酵素による消化\*

M<sup>2+</sup>

上記反応式において、p(dx)<sub>m</sub>は長さがm個の塩基のオリゴデオキシヌクレオチドであり、Nはアデニン、グアニン、シチジン、ウリジン、チミンまたはその修飾体のうちの1つである。nはDNA鎖に付加される単量体の数を表す。

好ましくは単量体は核酸のアミノアルキル誘導体を含むだろう。アミノ基は多数の蛍光剤と反応することができ\*

★  
M<sup>2+</sup>

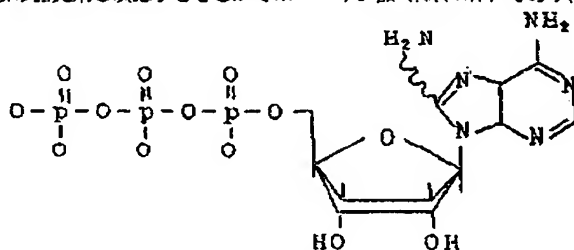
16

\*を数回行つて、大きいプローブセグメントを小さいプローブサブセグメント（その3' -および5' -末端を標識化するのに適している）に切断しうる。

プローブセグメントまたはサブセグメントの3' 末端の標識化は、活性化蛍光団との反応に利用し得る官能基をもつヌクレオチドの使用により達成される。官能基をもつヌクレオチドはターミナルデオキシヌクレオチシルトランスフェラーゼ（TdT）の使用によりプローブセグメントに付加される。酵素TdTはリボヌクレオチドの1個または2個の塩基をプローブセグメントに付加させるだけであり、従つてプローブセグメントへのヌクレオチドの尾部または伸長鎖の付加が回避されるだろう。ヌクレオチドの大きい尾部または伸長鎖は、標識成分間のエネルギー転移を変え、またプローブ鎖の標的鎖へのハイブリダイゼーションを変更もしくは損なう恐れのある立体効果を有するだろう。プローブセグメントの5' 末端の標識化は、二官能性脂肪族基を使用してプローブセグメントに標識成分を結合させることにより達成される。好ましくは標識成分は脂肪族ジアミンによつてプローブセグメントに結合される。

初めに一本鎖DNAの3' 末端の標識化について見ると、酵素TdTの使用によりヌクレオチドをDNA鎖に付加させる反応は次のように表わされる。

※きる。より好ましくは、アミノアルキル誘導体は第一脂肪族アミノ基を含む。酵素TdTおよびリボヌクレオチド単量体の使用は、DNA鎖への単量体塩基の付加を1個または2個の塩基に制限する。M<sup>2+</sup>は金属イオン補助因子を表す。好適なリボヌクレオチド誘導体の例は8-(6-アミノヘキシル)-アミノアデノシン-5'-三リン酸（AHA-ATP）であり、その構造を以下に示す。



化合物AHA-ATPは多種多様の蛍光標識の付加を可能にする種々の化学反応を受けることができる第一脂肪族アミノ基を含有する。

★ 従つて、DNA鎖の3' 末端はAHA-ATPおよびターミナルトランスフェラーゼとpH7において反応し、その反応は次のように表わされる。

★  
M<sup>2+</sup>



(9)

特許2619866

17

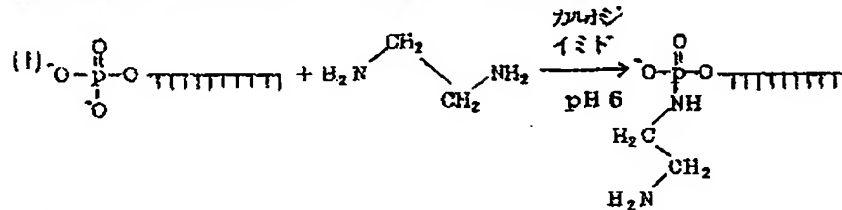
得られる生成物鎖は沈殿剤または可溶化剤、比色定置剤、発光剤、酵素または補助因子のような標識成分と反応し得るアミン官能基を含み、それにより標識成分をもつプローブを製造することができる。例えば、蛍光団イソチオシアネートはpH9.3でAHA-ATPのアミン官能基と反応してプローブ鎖を形成する。その他のアミン反応性蛍光団には例えばフルオレセインイソチオシアネート、スルホローダミン101スルホン酸クロリド（テキサスレッド）、N-ヒドロキシスクシンイミジルビレンブタンエート、エオシンイソチオシアネートおよびエリトロシンイソチオシアネートが含まれるが、これらに限定されない。適当な化学発光剤および補助因子にはアミン反応性ルミノール誘導体、ミクロベルオキシダーゼ、アクリジニウムエステル、ベルオキシダーゼおよびそれらの誘導体が含まれる。当分野で通常の知識を有する者は、アミン反応性でない蛍光剤および化学発光剤をアミン反応性\*

18

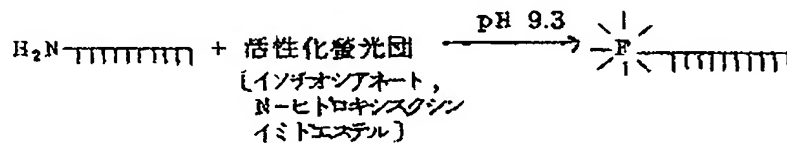
\*へと修飾して、本発明の標識成分として適するものにするることができることを認めるであろう。

DNA鎖はまたそれらの3'末端に1-N-エチノアデノシン-5'-三リン酸（EATP）のような蛍光ヌクレオチド誘導体をターミナルトランスフェラーゼ（TdT）の媒介により付加して標識化することができる。しかしながらDNAへのデオキシヌクレオチドの付加は標準化するの困難であり且つ立体効果を生じやすい多くの付加を含む尾部または伸長鎖をもたらすかも知れない。他の蛍光ヌクレオチド誘導には例えば3'-(ジメチルアミノナフトイル)-ATPまたは-CTPおよび/または蛍光性複素環を含むヌクレオチド三リン酸が含まれる。

一本鎖DNAの5'末端はそのDNA鎖の5'-リン酸を活性化蛍光団に結合させるエチレンジアミンを使用することによる2段階反応で標識化され、この反応は次のように表わされる。



(II)



合成ポリヌクレオチドは5'-ヒドロキシル基をリン酸化するための追加工程を必要とするだろう。リン酸化は工程(I)に先立つて酵素T<sub>4</sub>キナーゼを用いて行われる。

好ましくは、カルボジイミドは水溶性であり、例えば1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル)-カルボジイミドまたはp-トルエン-サルフェートおよびそれらの誘導体を含む。

エチレンジアミンポリヌクレオチド誘導体は標識成分と反応することができる（工程II）反応性アミン官能基を有する。反応性アミン官能基はpH9.3でイソチオシアネートと反応してプローブ鎖を形成するだろう。一方の末端標識（例えば5'末端標識）のための適当な標識成分は、他方の末端標識（3'末端標識）成分を補足するように選択される。適当な蛍光団には例えばフルオレセインイソチオシアネート、スルホローダミン101スルホン酸クロリド（テキサスレッド）、N-ヒドロキシスク

シンイミジルビレンブタンエート、エオシンイソチオシアネート、エリトロシンイソチオシアネートおよびそれらの誘導体が含まれるが、これらに限定されない。適当な化学発光剤および補助因子にはルミノール、ミクロベルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、アクリジニウムエステル、ルシゲニンおよびそれらの誘導体が含まれる。

今や第4図を参照すると、一本鎖DNAに関して説明された標識化法は、生物学的源から単離された二本鎖DNAセグメントにも応用できる。こうして、図示するように、細菌プラスミドから単離された代表的DNAセグメントは2本の相補的なDNA鎖（各DNA鎖は3'ヒドロキシル基と5'-リン酸基を有する）から成る。二本鎖DNAセグメントはエチレンジアミンおよび活性化蛍光団と反応させて、両方のDNA鎖の5'-リン酸位置に第1蛍光団（A）を同時に共有結合させることができる。

次に、二本鎖DNAセグメントはTdTの媒介によりAHA-ATPと反応させ、そして各DNA鎖の3'-位置に第2蛍光団

(11)

21

件を使用するであろう。ハイブリダイゼーションの最適速度は一般に融解転移温度より約20°～25℃低い温度で得られる。より高いストリンジエンシー (Stringency) のためには、ハイブリダイゼーションは融解温度の5°または10℃以内の温度で行われる。ラムダDNAの形のキヤリアーDNAの添加は、低濃度でプローブの安定性を高めることが判明した。いくつかの場合には、DNAの安定性を改善するためにEDTAも加えられた。滅菌剤や促進剤のような他の添加剤は、これらがプローブの作製に使用されるサイズオリゴマー (size oligomer) に効果的であり且つこれらの添加によつて蛍光バックグラウンドが非常に増加しない限り、ハイブリダイゼーション溶液中で使用することができる。

実験で使用する一般方法は、まず初めに標的とプローブDNAを一本鎖の形にする第1工程を含む。これは標的および試料DNAを含む試料を水浴中で加熱することにより達成された。長いDNA標的の場合は、一般に試料は沸騰水浴中で低塩緩衝液 (または蒸留水) 中約10分間加熱される。プローブは高温への長期暴露を避けるために、しばしばデハイブリダイゼーション法の終り付近で標的DNA含有試料に加えられた。デハイブリダイゼーションの最後に、ハイブリダイゼーションのための塩および緩衝剤の所望濃度を達成すべく、濃厚塩緩衝液を加えた。比較的小さいオリゴマー標的およびプローブは、より低い温度においてより高い塩緩衝液中で融解 (変性) される。通常のハイブリダイゼーションでは1MのNaClが使用されるが、DNAの融解温度を下げたい場合は100mMのNaClも使用できる。その後、標的およびプローブの両方を含む一本鎖試料はハイブリダイゼーション温度まで冷却させ、そして蛍光団標識の相互作用の程度を確かめるために蛍光測定を行った。ハイブリダイゼーション時間の長さは数分 (高プローブ濃度の試料の場合) から数時間 (低濃度のプローブDNAを含む試料の場合) まで変化した。

次の実施例は代表的な実験方法を説明するものであり、初めにプローブセグメントの3'末端標識化を示し、次にプローブセグメントの5'末端標識化を示し、そして最後に末端標識生成物の総合的均質検定法への応用について示す。

### B.3' -末端標識化

一本鎖DNAの3'末端は2工程反応で標識化した。第1工程では、反応性官能基をもつ1個のヌクレオチドを各DNA鎖の3'ヒドロキシル基に結合させるために、酵素TdTを使用した。第2工程は反応性官能基との反応によつて標識成分を各DNA鎖に結合させることを包摂していた。

次の方法は12塩基長のデオキシチミジン ( $dT_{12}$ ) の一本鎖ホモポリマー、それぞれ20塩基長のポリデオキシアデニンおよびポリデオキシチミジンの二本鎖ホモポリマー ( $dA_{20}$ 、 $-dT_{20}$ )、混合塩基合成オリゴマー、および

特許2619866

22

酵素AluIおよびHaeIIIで消化されたネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子フラグメントを含む、SP65のプラスミドフラグメントを使用して行つた。

今や第1工程をさらに詳しく見てみると、標準円錐形プラスチック管の中で約10n molのDNAを3.3mM AHA-ATP水溶液25.5μlと混合し、その試料を遠心真空装置 (Speed Vac, サバント) で乾燥させた。DNA/AHA-ATP溶液中のAHA-ATP分子:DNAの3'末端ヒドロキシル基の比は約10:1であつた。DNA/AHA-ATP溶液に、TdT反応緩衝液30μl、ウシ血清アルブミン20μl (水1ml当たりウシ血清アルブミン500μg)、TdT500単位、および水を加えて70μlの反応混合物を得た。この反応混合物を37℃の水浴中で18~24時間インキュベートさせた。

セルロース粒子に固定した相協的ホモポリマーに上記ホモポリマーを10℃で結合させ、続いて結合緩衝液を用いてそのセルロースを20℃で洗浄することにより、個々のホモポリマー鎖を未反応のAHA-ATPから分離した。次に、生成物を溶離して、pH9.3の0.05Mホウ酸緩衝液中にセルロース粒子から分離した。

ホモポリマー二本鎖、混合塩基オリゴマー、およびSP65二本鎖プラスミド制限フラグメントはセファデックスG-25クロマトグラフィー媒質および水またはホウ酸緩衝液での溶離を使用するゲル透過クロマトグラフィー、あるいはバイオラッド研究所で製造したNACSイオン交換カラムのようなイオン交換カラムにより未反応のAHA-ATPから分離した。

第2工程では、一本鎖ホモポリマー、混合塩基オリゴマー、二本鎖ホモポリマー、または二本鎖プラスミドフラグメントを一まとめにして考えると、AHA-ATPと各DNA鎖の3'末端との反応により形成された末端アミノヘキシルアミノアデニンの第一脂肪族アミノ基に、アミン反応性蛍光団が共有結合された。アミン反応性蛍光団にはスルホローダミン101 (テキサスレッド)、ビレンブタノエート、フルオレセイン、エオシンおよびエリトリン、イソチオシアネート誘導体、スルホン酸クロリド、およびN-ヒドロキシスクシンイミドエステルが含まれる。アミン反応性蛍光団は適当な非反応性可溶性溶剤に溶解され、N-ヒドロキシスクシンイミドビレンブタノエートはアセトンに、スルホローダミン101スルホン酸クロリドはジメチルホルムアミドに、そしてフルオレセインイソチオシアネートはジメチルスルホキシドにそれぞれ溶解した。0.01モルの蛍光団溶液を、AHA-AMF結合DNA鎖を含む0.05モルのホウ酸/水酸化ナトリウム緩衝液 (pH9.3) に飽和し攪拌しながら滴下した。AHA-AMF結合DNA鎖に対して20倍~200倍モル過剰の反応性蛍光団を使用して、この反応を目的生成物へと至らしめた。反応は18~24時間続けた。反応時間の終りに、蛍光団標識化一本鎖ホモポリマーをマフィンティクロマトグラフィーにより単離した。蛍光団標識化された二本鎖ホモポリマー、混合塩基オリゴマー、およびプラスミド、SP65

(12)

特許2619866

23

の制限フラグメントはNACSカラムまたは上記のようなゲル透過クロマトグラフィーにより単離した。蛍光団標識化された一本鎖ホモポリマー、混合塩基オリゴマー、二本鎖ホモポリマー、および二本鎖プラスミドフラグメントは水もしくは結合緩衝液中に単離した。長期貯蔵のために、蛍光団標識化DNA溶液は遠心真空濃縮器で濃縮乾燥させ、 $-20^{\circ}\text{C}$ で貯蔵した。

上記の2工程3'末端標識法の別法として、ポリヌクレオチドは酵素T<sub>4</sub>を用いて蛍光ヌクレオチドにより直接標識化することができる。例えば、一本鎖ホモポリマー鎖はANA-ATPを一本鎖DNAの3'末端に付加する方法と同じ方法を用いて、その3'末端が蛍光団、1,N'-エチノアデノシン三リン酸 (EATP)、修飾ヌクレオチドで標識化された。

上記方法は表1に示すように一本鎖および二本鎖オリゴマーの3'末端に位置づけられた蛍光標識成分をもたらしした。

表1 3'末端標識化DNA  
オリゴマー

オリゴマー	標識用化合物	オリゴマー当たりの標識
dT <sub>12</sub>	フルオレセインイソチオシアネート	0.88
dT <sub>12</sub>	フルオレセインイソチオシアネート	0.72
dT <sub>12</sub>	1,N'-エチノアデノシン	0.95
dT <sub>12</sub>	1,N'-エチノアデノシン	1.0
dT <sub>12</sub>	スルホローダミン101スルホン酸クロリド(テキサスレッド)	1.1
dT <sub>12</sub>	スルホローダミン101スルホン酸クロリド(テキサスレッド)	0.98
dT <sub>12</sub>	N-ヒドロキシスクシンイミジルビレンブタノエート	0.62
dT <sub>12</sub>	N-ヒドロキシスクシンイミジルビレンブタノエート	0.85
dT <sub>12</sub>	エオシンイソチオシアネート	1.1
dT <sub>12</sub>	エリトロシンイソチオシアネート	2.6
dT <sub>12</sub>	N-ヒドロキシスクシンイミジルビレンブタノエート	0.59
dT <sub>12</sub>	エオシンイソチオシアネート	1.8

#### C.5'末端標識化

DNAの一本鎖ホモポリマー、DNAの二本鎖ホモポリマー、およびプラスミドDNAの制限フラグメントの5'末端は2工程反応で標識化した第1工程では、DNA鎖の末端5'リン酸基と反応性の二官能性有機分子(5'リン酸基を標識成分に結合しうる)とをチュー(B.C.F.Chu)、ワール(G.M.Wahl)およびオーゲル(L.Orge1), Nucleic Acids Research, 11(18), 6513-6529(1983)に記載の方法に従って縮合させた。第2工程はDNA鎖/反応性有機分子を標識成分と反応させてブロープ鎖を形成させることを包含する。

当分野で習熟した者は、多くの形の天然に存在するDN

24

Aがその5'末端でリン酸化されることを認めるであろう。非リン酸化DNAは酵素T<sub>4</sub>キナーゼを用いる初期リン酸化工程を必要とし、この方法は当分野でよく知られている。5'-DNA末端標識システムについてのベセスダ・リサーチ研究所の製品カタログを参照されたい(ここに参照により引用される)。

例えば、第1工程を詳細に説明すると、水溶性カルボジイミドの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミドを用いて、エチレンジアミンと、一本鎖DNA、二本鎖ホモポリマーおよびSP65プラスミドの二本鎖制限フラグメントの末端5'リン酸基とを縮合させた。反応混合物は50n molのDNAを500μlの水に溶解し、0.5Mエチレンジアミン、0.2Mカルボジイミドおよび0.2M- (N-モルホリノ)-エタンスルホン酸を含有する500μlの反応溶液(pH5.0に調整)と混合することにより調整した。この反応混合物を室温で16~24時間攪拌した。

エチレンジアミンと反応したDNAの一本鎖ホモポリマーは、反応混合物に塩化ナトリウムを1モル濃度になるまで加え、次にその混合物をセルロースに固定した相縮的ホモポリマーを含むカラムに10°Cで通すことにより精製した。その後カラムは結合緩衝液を用いて10°Cで、次に20°Cで洗浄した。エチレンジアミンと反応したDNAホモポリマーは50~65°Cの温度でそのカラムに0.05Mホウ酸緩衝液を通すことにより回収した。

二本鎖ホモポリマー、混合塩基オリゴマーおよびプラスミドDNAの制限フラグメントは、エチレンジアミンと反応したDNAをセファデックスG-25カラムに通し、ホウ酸/水酸化ナトリウム緩衝液で溶離することにより精製した。別の精製法は低塩緩衝液中でエチレンジアミン反応DNAをバイオラッドNACSカラムに結合させ、高塩緩衝液または2.0M酢酸アンモニウムで溶離することを包含する。2.0M酢酸アンモニウムで溶離した試料は、遠心真空装置または凍結乾燥器を用いて緩衝液を除去すべく乾燥させた。

第2工程では、反応性有機成分のエチレンジアミンと結合したDNA鎖を反応性蛍光団とさらに反応させてブロープ鎖を製造した。より詳細には、アミン反応性蛍光団(イソチオシアネート誘導体またはN-ヒドロキシスクシンイミドエステル)を適当な非反応性可溶性溶剤に溶解した。エチレンジアミン反応DNAを含む0.05Mホウ酸緩衝液にpH9.3で絶えず攪拌しながら0.01M蛍光団溶液を滴下した。反応性蛍光団はこの反応を目的生成物へと至らせるために20倍~200倍モル過剰に加えた。反応は攪拌下に16~24時間継続した。

反応時間の終りに、5'-蛍光団標識化DNAを尹過した。5'-蛍光団標識化ホモポリマー一本鎖DNAはアフィニティクロマトグラフィーにより単離した。5'-蛍光団標識化された二本鎖DNA、混合塩基オリゴマー、または標識プラスミド制限フラグメントはNACSカラムもし

(13)

特許2619866

25

くはゲル透過クロマトグラフィーにより単離した。5'-  
-螢光団標識化二本鎖ホモポリマーまたはプラスミド制  
限フラグメントはその後水もしくは結合緩衝液中に単離  
した。5'-螢光団標識化一本鎖DNAは下記の表2に示  
される。

表2 5'末端標識化DNA

オリゴ マー	オリゴマー	
	標識用化合物	オリゴマー当 たりの標識
dA <sub>12</sub>	フルオレセインイソチオシアネ ート	0.89
dA <sub>13</sub>	フルオレセインイソチオシアネ ート	0.96
dA <sub>14</sub>	N-ヒドロキシスクシンイミジ ルピレンブタノエート	0.70
dA <sub>16</sub>	フルオレセインイソチオシアネ ート	1.1
d(AC) <sub>3</sub>	フルオレセインイソチオシアネ ート	0.59
d(AC) <sub>5</sub>	フルオレセインイソチオシアネ ート	0.90

5'末端標識化ホモポリマーブローブ鎖は相補的な  
3'末端ホモポリマー鎖と結合して、二本鎖（一方の鎖  
の3'-標識成分が他方の鎖の5'-標識成分と相互作  
用する位置にある）を形成することができる。5'-お  
よび3'-ホモポリマー二本鎖およびプラスミド制限フ  
ラグメントは、2本の末端標識化相補的ポリヌクレオチ  
ドブローブ鎖を含む。

表 3

## 二重末端標識化二本鎖

二本鎖	5'-標識化		3'-標識化		ハイブリッド形に対す る非ハイブリッド形の 蛍光強度
	標識用化合物	二本鎖当 たりの標識	標識用化合物	二本鎖当 たりの標識	
dA <sub>16</sub> ・dT <sub>20</sub>	フルオレセインイソチオ シアネート	0.61	N-ヒドロキシスクシン イミジルピレンブタノエ ート	1.0	3.9
dA <sub>16</sub> ・dT <sub>20</sub>	フルオレセインイソチオ シアネート	1.2	エオシンイソチオシアネ ート	3.1	2.6
*プラスミドI	フルオレセインイソチオ シアネート	3.2	N-ヒドロキシスクシン イミジルピレンブタノエ ート	2.7	4.1
*プラスミドII	フルオレセインイソチオ シアネート	1.3	N-ヒドロキシスクシン イミジルピレンブタノエ ート	1.4	4.0
*プラスミドIII	N-ヒドロキシスクシン イミジルピレンブタノエ ート	1.7	フルオレセインイソチオ シアネート	0.32	0.91
**トキシン	フルオレセインイソチオ シアネート	(+)0.45 (-)0.49	N-ヒドロキシスクシン イミジルピレンブタノエ ート	(+)0.46 (-)0.60	2.3

\* Alu I および Hae III 酵素で消化された、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子を含むpSP65(ウイス  
コンシン州マジソン、プロメガバイオテック社)。

\*\* 大腸菌エンテロトキシン遺伝子に相補的な合成オリゴマー。

今や表3を参照すると、ホモポリマー二本鎖、混合塩  
基オリゴマー、およびプラスミド制限フラグメントはそ  
れぞれの各鎖の3'末端および5'末端の両方に標識を

26

\* 多数の二本鎖ブローブはまた大腸菌エンテロトキシン  
遺伝子の合成DNAから作ることができる。オリゴマーの  
相補対を合成して、その後標識した。大腸菌エンテロ  
トキシン/遺伝子のゲノム上の5つの異なる領域に対応  
する塩基配列をもつ5対のオリゴマーを製造した。4対は  
21塩基長のオリゴマーを含み、1対は22塩基長のオリゴ  
マーを含んでいた。10の一本鎖オリゴマーは標識するた  
めに2群に分けた。1群はそれぞれの相補対の一員を含  
み、他群は他の対員を含んでいた。ターミナルトランス  
フェラーゼ反応混合物中にハイブリダイズしたDNAを選  
けるために、非相補鎖同士を1つの群に集めた。末端ヌ  
クレオチドの酵素付加は、平滑末端の二本鎖DNAプライ  
マーを使用する場合にあまり効率がよくない。この方法  
の標識効率は先の二本鎖ブローブ製造のときに得られた  
もののほど高くなかったが、ハイブリダイゼーションに関  
連する蛍光の変化は相当に低いブローブ濃度でそれを検  
出するのに十分なほど大きかった。

二本鎖ホモポリマー、プラスミド制限フラグメントお  
よびトキシン遺伝子ブローブは下記の表3に示される。

含む。表1、2および3は二本鎖当たりの標識または一  
本鎖当たりの標識を、標識化反応の効率の表示として表  
す。ブローブ当たりの標識の数は吸光分光分析法により

(14)

27

測定した。

相補のプロープ鎖の標識成分は、それらのプロープが互いに結合した位置にあるとき、第5図にグラフで示すように相互作用することができる。第5図は温度がハイブリダイズしたプロープの融解温度に関して変化するときの温度に対する蛍光放出の関係を示している。プロープはそれぞれ12塩基長のデオキシアデノシンとデオキシチミジンのホモポリマー二本鎖であり、5'-フルオレセインと3'-スルホローダミンの標識群を含む。図示するように、中空の円および三角形はプロープ含有試料の温度が降下しつつあるときに得られた値を表わす。中空の円および三角形はプロープ含有試料の温度が上昇しつつあるときに得られた値を示す。三角形によつて示された点は蛍光放出の温度消光についての補正値を表わす。円によつて示された点は実値を表わす。

より詳細には、第5図の融解曲線データは、1N NaClおよび0.02Nリチウムからなる緩衝液 (pH7.5) 中のDNA試料について記録したものである。第5図にプロットしたデータは等モル量 (0.1μM) の5'-フルオレセイン-dA<sub>12</sub>およびdT<sub>12</sub>-スルホローダミン-3'を混合し、多くの試料温度での試料の平衡化の後に蛍光放出を測定することにより得た。また蛍光放出に対する温度の影響を調べるために、5'-フルオレセイン-dA<sub>12</sub>単独の蛍光を同一温度で測定した。5'-フルオレセイン-dA<sub>12</sub>単独測定からのデータは2種のプロープ試料について記録された融解曲線を補正するために使用した。補正データおよび未補正データの両方をプロットした。

プロープを冷却して再アニーリングするとき、蛍光放出が抑制されて蛍光信号強度の減少が生じる。プロープを融解温度または変性温度に加熱するとき、プロープは分離して標識成分同士の相互作用がなくなる。蛍光放出はもはや抑制されず、蛍光放出が増大する。

第5図に示す標識成分の相互作用は、DNAハイブリダイゼーションを溶液中で測定するための慣用方法で測定した「非標識」プロープの融解温度データと一致する。第6図は温度が非標識プロープの融解温度により変化するときの温度と、260nmでの光エネルギーの吸光度との関係をグラフによつて示している。第6図に示すプロープは12塩基長のデオキシアデノシンおよびデオキシチミジンのホモポリマーを含む。中空の円で示したグラフの点は試料の温度が降下しつつあるときに読み取ったものである。中空の円は試料の温度が上昇しつつあるときに読み取ったものである。プロープの温度がプロープの融解温度により変化するにつれて、260nmでの吸光度は塩基対の減少が原因で約0.135から約0.182まで増加した。吸光度測定によつて得られた非標識DNAの融解温度は、蛍光団の相互作用により測定した標識DNAの融解温度と同じであり、このことはDNAの標識化がハイブリダイゼーション過程を妨害しないことを示している。

標識成分の相互作用はまた表3および表4に示され

特許2619866

28

る。表3は非ハイブリッド形に対するハイブリッド形の標識ホモポリマー複合体およびプラスミド制限フラグメントの蛍光強度の比較を含む。ハイブリダイズしたプロープの信号に対するハイブリダイズしなかつたプロープの信号の比は4.1程度に高いこともあり得る。

表4はハイブリダイズした標識プロープに対するハイブリダイズしなかつた標識プロープの蛍光強度の比較を示す。

表 4  
相補的一本鎖標識プロープ  
における蛍光団の相互作用

5' 標識オリゴ	3' 標識オリゴ	オリゴマーの長さ (塩基性)	検出した標識	ハイブリッド形に対する非ハイブリッド形の蛍光強度
フルオレセイン	スルホローダミン	12	5'	5.4, 1.7
フルオレセイン	ビレンブタノエート	12	5'	6.2, 6.9, 6.0
ビレンブタノエート	フルオレセイン	12	3'	1.4
ビレンブタノエート	ビレンブタノエート	12	両方	1.5
フルオレセイン	フルオレセイン	12	両方	1.7
アクリジン	フルオレセイン	12	3'	1.2
アクリジン	スルホローダミン	12	3'	.88
フルオレセイン	エチノアデノシン	12	5'	0.67
フルオレセイン	エオシン	12	5'	2.8, 13.5
フルオレセイン	エリトロシン	12	5'	1.8
フルオレセイン	エオシン	20	5'	5.9
フルオレセイン	ビレンブタノエート	20	5'	3.6

表3および表4において、蛍光の変化はハイブリダイゼーション条件下で観察された蛍光に対する非ハイブリッド状態の一方または両方の標識の蛍光の比として表わされる。データはハイブリダイゼーション状態を選択するために温度を使用した実験；相補のプロープを一緒に、その後単独で試験した実験；またはプロープのハイブリダイゼーションを大過剰（通常10倍またはそれ以上）の非修飾相補DNAの存在または不在で行った実験；のいずれかから得られた。後者の実験において、大過剰の標的DNAは相補的DNAプロープ同士が互いにハイブリダイズすることを妨げる競合的ハイブリダイゼーション反応をもたらす。同じ標識オリゴマーの異なる設法を試験したプロープ対については、蛍光変化の複数の値が記入されている。表4はオリゴマーの単一標識化によつ

(15)

特許2619866

29

て作られたプローブを使って得られたデータを含む。これらのプローブの組成は表1および表2に載っている。表3のデータは第1蛍光団が各オリゴマーの5'末端にあり且つ第2蛍光団が3'末端にあるように標識されたプローブから誘導される。ハイブリダイゼーション条件において、一方の鎖の5'第1蛍光団が相補鎖の3'第2蛍光団とさきわめて接近する。

表3および表4は2つの標識の少なくとも1つの蛍光に有意な変化が生じる数種の標識の組合せを示す。フォルスター（Forster）型エネルギー転移機構では、比較10の長い波長の光を吸収および放射する標識は、その標識の励起の際に他の標識（エネルギー供与体）からのエネルギーを受けとることが予期される。その標識が蛍光である場合、これはエネルギー受容標識からの発光の増加に伴って起こるエネルギー供与標識からの発光の減少をもたらす。この機構に適合しうる挙動を示す標識の組合せはフルオレセイン/スルホローダミン101、アクリジン/スルホローダミン101、フルオレセイン/エチノアデノシン、フルオレセイン/エオシンおよびフルオレセイン/エリトロシンである。

しかしながら、表3および表4はフォルスター型機構に従って行動しないいくつかの相互作用を示す。フォルスター型エネルギー転移機構と一致しない挙動を示す標識の組合せはフルオレセイン/ビレンブタノエートおよびフルオレセイン/アクリジンである。

たとえいくつかの標識組合せがフォルスター型エネルギー転移の典型的な行動を示すとしても、相互作用のメカニズムは2つの標識の一方だけから収集されたデータからは確認することができない。試験した標識組合せにおいて、標識の他方の一員はDNAに結合したとき本質的に非蛍光性であるか、あるいはハイブリダイゼーションの状態にほとんど影響を受けない蛍光を示した。標識の相互作用の仕方の不確かさは、2つの標識分子を互いの衝突距離内にもたらす能力の結果である。衝突による相互作用が可能である場合、動的消光のいろいろな機構が競合して、観察される相互作用を支配しうる。接近した箇所の動的相互作用はまた静的相互作用よりも実際上顕著であると思われる。

表3および表4に示したいくつかの蛍光変化は、タンパク質分子（すなわち抗体および/またはタンパク質抗原）のランダム標識化を当てにして両方または一方の標識物質を作らねばならない消光/エネルギー転位に基づくイムノアッセイにおいて観察されたものよりも大きい。従って、抗原：抗体複合体では標識のはんの少しの画分のみが互いの静的または動的相互作用にとつて適した位置にあるかも知れない。一方、DNA末端の選択的標識化は相対する標識の正確な位置づけを可能にし、それ故にハイブリダイズしたプローブ鎖の全ての標識によつて衝突の相互作用が可能となり、また静的な相互作用が認められる。

30

表3および表4のデータはまた標識をDNAに結合させる方法を適切に選択することの必要性を指摘している。フルオレセインが3'末端にあり且つビレンブタノエートが5'末端にある実施例の場合は、標識の相互作用がたとえあつたとしてもほとんど観察されず、一方フルオレセインが5'末端にあり且つビレンが3'末端にある場合は相当な相互作用が検出される。これは制限酵素で消化したプラスミドDNAばかりでなくホモポリマーオリゴマーにも観察された。標識の配置の相違は2つの別々の末端に標識を結合させる際に使用した異なる化学に関係しており、3'-標識はアミノヘキシルアミノアデノシンリンカーを介して結合されるが、5'-標識はエチレンジアミンリンカーを介して結合された。

#### D. 競合的検定

本発明の試薬プローブは競合的DNA検定に応用した。このハイブリダイゼーション法は5'-フルオレセイン-dA<sub>2</sub>およびdT<sub>12</sub>-スルホローダミン-3'ホモポリマーを含むプローブに特徴的である。

第7図を参照されたい。ここではプローブと標的DNAの溶液が混合された。プローブの濃度は0.1μMに定め、標的濃度はゼロから0.5μMの間で変えた。プローブは標的DNA、十分量の水および緩衝液（pH7.5で1.0M塩化ナトリウムおよび0.01〜0.02M塩基性リン酸カリウムの最終濃度を与える）と混合してハイブリダイゼーション溶液を調製した。この溶液を水浴中65°Cで15分間加熱して、標的とプローブDNAの完全なデハイブリダイゼーションを行った。次に試料を2時間かけて16°Cへと冷却させ、競合的ハイブリダイゼーションを起こさせた。

第7図はフルオレセインイソチオシアネート（フルオレセイン）で標識化したデオキシアデノシンホモポリマーおよびスルホローダミンスルホン酸クロリド（スルホローダミン）で標識化したデオキシチミジンホモポリマー（各々12塩基長）からなる一定濃度の10'モル二本鎖プローブを含むいろいろな濃度の標的鎖についての、蛍光強度（相対単位）対波長の関係をグラフにより示している。全ての試料は300nmの光エネルギーを照射した。

約520nmの波長でのピーク蛍光強度は、12塩基長のデオキシアデノシンおよびデオキシチミジンの標的ホモポリマーの濃度変化により変化する。

第8図は標的濃度に対する蛍光放出の関係を示す。第8図のグラフの点は一定濃度のプローブを使用した第7図のグラフのピーク値である。標的濃度が増すにつれて、スルホローダミンによる蛍光消滅度が低下して蛍光放出が増大する。

5'-フルオレセイン-dA<sub>2</sub>/dT<sub>12</sub>-ビレンブタノエート-3'系について先に示したハイブリダイゼーションデータは、相互作用する標識に基づいた競合的DNAハイブリダイゼーション検定の概念を説明する上で役に立った。しかしながら、有用な検定系であるためには、この方法が特異的であり且つ感度が優れていることを示さ

31

ねばならない。

第9～12図のデータは標識の相互作用に基づく検定法のこれらの面を立証するのに役立つ。標識の特異性は表3に示した最初の $dA_{10}$ 、 $dT_{10}$ 。誘導二本鎖プローブを使つて第9図に示される。

この実験では、50nMプローブ溶液といろいろな濃度の3つの異なる標識DNAとを水中で混合した。1つの標識は等モル量の $dA_{10}$ および $dT_{10}$ から成っており、これはプローブとのハイブリダイゼーションにふさわしい標識であつた。2つの非相補標識はウシ胸腺DNAとラムダファージDNAであつた。試料は沸騰水浴中で6分間加熱し、その後室温まで冷却させた。次いで試料を2X濃縮結合緩衝液で半分に着脱して、pH7.5においてそれぞれ100nMと10nMの最終NaClおよびリン酸カリウム濃度を得た。その後室温での蛍光スペクトルを各試料について記録した。

第9図にプロットした蛍光強度データは、正しい標識DNA ( $dA_{10}$ 、 $dT_{10}$ ) を使用した場合に、予測された濃度依存性の競合的ハイブリダイゼーション挙動を示す。標識DNA濃度は異なる分子量の標識を使用したので塩基対に換算してプロットした。各試料中に含まれる標識二本鎖プローブの対応する塩基対濃度は1  $\mu$ M (50nM二本鎖プローブ) であつた。約1.2  $\mu$ Mの $dA_{10}$ 、 $dT_{10}$  (1  $\mu$ Mの値に近い) のところで生じた蛍光変化の中間点は、相補標識鎖が相補プローブ鎖に対してもつと同じ親和性を互いに対して有する競合的ハイブリダイゼーションを予期させた。非相補的標識DNA (ウシ胸腺DNAとラムダDNA) を使つて集めたデータは、過剰の非相補的DNAが相補的プローブ鎖同志のハイブリダイゼーションを妨げなかつたので、プローブが $dA_{10}$ 、 $dT_{10}$ 標識DNAに対して特異的であることを示した。

ハイブリダイゼーションの検定の感度は、比較的低いプローブ濃度で競合的ハイブリダイゼーションを行うことにより証明した。500pM、50pMおよび5pM濃度の標識 $dA_{10}$ 、 $dT_{10}$ 。プローブを用いた競合的ハイブリダイゼーションから得られたデータを第10図に示す。これらの実施では、プローブと標識DNAとをpH7.5の100nM NaClおよび10mMリン酸カリウムを含む緩衝液中で混合した。次いで試料を80°Cで10分間加熱し、その後5度/時間の割合で20°Cまで低下させた。これはコンピュータ制御水浴を使つて行つた。蛍光放出は20°Cで各試料について測定した。標識濃度の開数としての蛍光放出強度の特徴的なS字状依存がそれぞれのプローブ濃度で観察され、そして蛍光強度変化の中間点はより低いプローブ濃度を使用する検定に対してより低い標識濃度で生じた。最も低いプローブ濃度 (5pMプローブ) を使用する検定の場合は、蛍光変化の中間点が約20pM標識であつた。これらの実験で使した試料は、標準セミマイクロ蛍光キュベットを使用したもので1mlの容量であつた。これは20fmoleの標識DNAに相当した。他の技法によるDNAハイブリダイゼーションは

(16)

特許2619866

32

しばしば10  $\mu$ l程度の容量を使用して行われる。同様の容量の使用を可能にする蛍光計のために試料用セルを工夫することができ、その結果蛍光変化の中間点については200amol/lと約100倍の感度の増加をもたらすであろう。この実験では5pMプローブを使用する最大蛍光変化が緩衝液の蛍光とほぼ同じ大きさであるので、感度の大きい増加はプローブ濃度をこれ以上低下させても期待されない。換言すれば、信号対ノイズの比は1に等しかつた。緩衝液のバックグラウンドは第10図に示すデータから差し引かれる。

検定感度の増加を可能にする1つの方法は、対象とするゲノムの異なる領域とハイブリダイズする複数のプローブを使用することである。これに関する2つの手法が試験された第1の手法では、制限酵素の使用により天然DNAから複数の二本鎖プローブを作製した。ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子を、SP65プラスミド (ウイスコンシン州マジソン、プロメガ・バイオテック社) に挿入して、このプラスミドを大腸菌内で増殖させた。次いで、数ミリグラムのプラスミドDNAを大腸菌培養物から単離し、このプラスミドDNAを2種類の制限酵素Alu IおよびHae IIIで処理した。これは大きさが約6塩基対から600塩基対 (DNA配列分析による) までの範囲の約370の平滑末端二本鎖をプラスミド1つにつきもたらした。その後二本鎖の集団は $dA_{10}$ 、 $dT_{10}$ 。プローブを標識するときに使用した通常の5' - および3' - 標識法により標識付けした。ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子はこの初期実験を単純化するために、一般には望まれることだが、プラスミド、SP65から遊離の状態では単離しなかつた。この制限酵素切断プラスミドの数種の標識化調製物は表3に載っている。

第11図はネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子を含む粗々の濃度の未切断SP65プラスミドを検索するために、表3に記載の第1のプラスミド調製物を用いて行つた競合的ハイブリダイゼーションからのデータを示す。プラスミドプローブは2.7pMの完全プラスミドに対応する濃度で存在していた (標識化二本鎖の合計100pM)。水中のプローブおよび標識DNAは沸騰水浴中に12分間置き、次にNaClとリン酸カリウムの最終濃度をそれぞれ1mMおよび10mMとするために2X濃縮結合緩衝液を添加しながら室温まで冷却させた。

フルオレセイン放出は各試料について異なる時間間で記録した。第11図にプロットしたデータは1.5時間および5時間で測定されたフルオレセインに相当する。両方のフルオレセイン値は予測されたように標識濃度が増加するにつれて減少することが示されている。

試験した標識濃度範囲は温度に関する蛍光変化の全範囲を示すには十分大きくないが、検定は使用したプローブの対応濃度に相当する少なくとも数ピコモルの感度を示す。仮説的な10  $\mu$ l試料では、数ピコモル標識が約30 amoleに相当する。この実験において、フルオレセイン



(17)

33

放出強度はバックグラウンドフルオレセインの大きさの程度よりも大きかった。

ハイブリダイゼーションはプラスミドのランダム制限消化から生ずるプローブの長さおよび広範囲の融解温度に関するプローブの不均一集団のために困難であることが予測される。それゆえに、出来るだけ均一な大きさのプローブ集団を作るべく制限酵素を注意深く選択することが有利であるだろう。クローン化DNAからこのような均一集団を作るために、ゲノム内に新しい制限部位を遺伝子操作により加えてもよい。

大腸菌エンテロトキシン遺伝子の検定を示す第12図を今や参照すると、約100塩基対のエンテロトキシン遺伝子フラグメントから成る標的DNAがpH7.5の1mM EDTAおよび10mM トリスを含む緩衝液750 $\mu$ l中でラムダDNA(キヤリアーDNA) 14 $\mu$ gと混合された。この溶液を沸騰水浴中に12分間おき、その後表3に「トキシン」として示した二本鎖プローブDNAを加え、この溶液を沸騰水浴に戻してさらに2分間加熱した。次いで蛍光計のサーモスタット付きキュベットホルダー内に収容された蛍光キュベット中の2 $\times$ NaCl/リン酸緩衝液700 $\mu$ lにこの溶液を加え、42 $^{\circ}$ C(プローブの融解温度より25 $^{\circ}$ C低い温度)に維持した。ラムダDNA、塩化ナトリウムおよびリン酸カリウムの最終試料濃度はそれぞれ10 $\mu$ M、1Mおよび0.01Mであった。

蛍光強度は前の実験とは異なる方法で測定した。蛍光値は検出用エレクトロニクスにインタフェースで接続したコンピュータの使用(物質および方法の部参照)により時間と共に連続して記録した。この方法で集めたデータは異なる濃度のエンテロトキシン標的を含む試料について第12図にプロットした。初期および最終蛍光値を記録することによって、試料間で変動するバックグラウンド蛍光レベルから独立した蛍光変化が得られた。第12図のデータ記録は各組のデータが同じ初期蛍光値を含むように相殺した。この効果は試料間で変動するバックグラウンドを取り去ることである。各試料の蛍光変化は存在する標的DNAの量に関係する。検出可能な最も低い標的濃度は4pMであることがわかった。従って、仮説的な10 $\mu$ l試料はこの濃度で40fmoleの標的を含むだろう。蛍光強度を時間と共に連続して記録することの2番目の利点は、蛍光変化の時間依存性が平衡値へのデータの外挿を可能にする運動学的方程式にあてはめることができるので、より短いハイブリダイゼーション時間を使用し得るということである。蛍光変化の相対度は第12図に示す実験について2時間にわたって時々微分すればよい。

前記実施例は特定の蛍光団を記録したものであるが、本発明は他のアミン反応性蛍光団および化学発光剤にも応用できる。アミン反応性蛍光団には例えば前述のフルオレセイン、ビレン、アクリジン、スルホローダミン、エオシン、エリトロシンおよびそれらの誘導体が含まれる。アミン反応性化学発光剤には例えばミクロベルオキ

特許2619866

34

シダーゼ、ルミノール、イソルミノール、グルコースオキシダーゼ、アクリジニウムエステルおよびそれらの誘導体が含まれる。

化学発光剤はプローブの化学発光標識成分が第2相補的プローブの蛍光団と相互作用するように、蛍光団に関連して本検定に用いられる。蛍光団は標識成分が解れるまで化学発光剤の発光を抑えるだろう。発光反応を開始させるために、試料媒体に適当な化学発光補助因子も加えられるだろう。標的がプローブと結合部位について競合したとき、標識成分は分離して化学発光剤または化学発光成分を発光させ、そして検出可能な信号を発生することができる。

化学発光剤はまた化学発光補助因子との組合せで本発明に用いられる。こうして、第1プローブの化学発光標識成分は第2相補プローブ上の化学発光補助因子標識成分と相互作用するであろう。この系は特定強度の光を発する。標的が存在する場合、標的はプローブと競合し、それにより第1および第2プローブおよび標識成分を分離し且つこの系の発光を抑制するだろう。

20 蛍光団標識化プローブはバックグラウンド蛍光を制限するために時間分解検定法において利用される。従って、光パルスは第1蛍光団を励起するのに十分な波長で導入される。第1蛍光団はそのエネルギーを第2蛍光団に転移する。第1蛍光団から第2蛍光団へのエネルギーの転移および第2蛍光団によるエネルギーの放出は、直接蛍光に比べてゆつくりした過程である。第1蛍光団はエネルギー転移過程を引き延ばすために、長い発光寿命を有するように選ばれる。試料はパルス後、そのパルスによつて開始された直接蛍光活性が終了した後に、および転移したエネルギーが第2蛍光団から発せられる間に、第2蛍光団からの光エネルギーについて監視することができる。エネルギーを転移する位置にある蛍光群のみが監視される発光を生ずるだろう。相互作用する位置にある相補的プローブの標識成分のみが検出可能な信号をもち、それによりバックグラウンド発光が抑えられるだろう。

時間分解検定法の詳しい説明は本発明者の係属中の米国特許出願第738560号に開示されており、これは参照によりここに引用される。

40 こうして、本発明は均質な非放射性検定を特徴とする。本検定の均質性により、比較的短時間で検定を行うことができる。非放射性標識を使用すると、特別の許可がなくても本検定を行うことができ、また検定技術および製造技術が単純化される。

本発明はその好適な実施態様について説明してきたが、本発明は変更および修飾が可能であり、それゆえに先に記載の細部に限定されるべきでなく、特許請求の範囲に含まれる種々の変更および修正を加え得ることを理解すべきである。

50 【図面の簡単な説明】

(18)

特許2619866

35

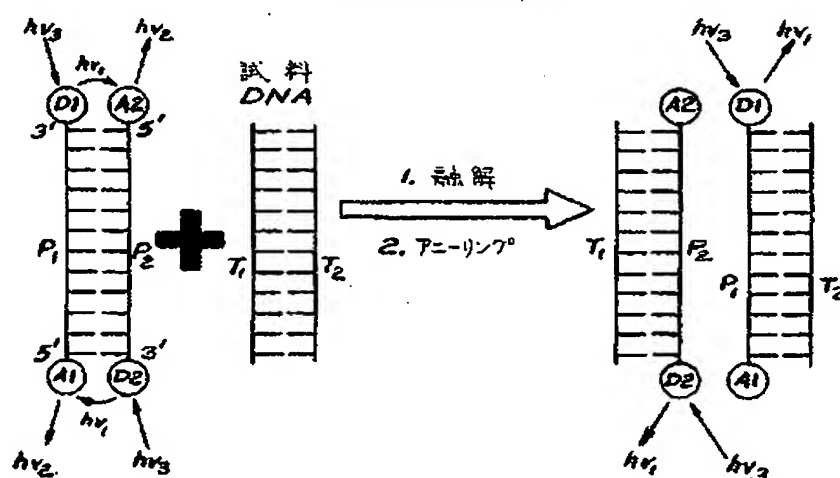
36

第1図は本発明の競合的DNA検定を示す模式図であり；  
第2図は本検定を行うための自動分析装置の略図であり；  
第3図はクローン化DNA由来の二本鎖プローブの作製を示す模式図であり；  
第4図は二本鎖プローブの末端標識化を示す模式図であり；  
第5図は相補プローブ鎖の標識成分が相互作用するときの蛍光放出と温度の関係を示すグラフ（融解曲線）であり；  
第6図は非標識プローブの融解曲線を示すグラフであり；  
第7図は一定濃度の二本鎖プローブを含む異なる濃度の標的鎖についての蛍光強度と波長の関係を示すグラフであり；  
第8図は競合的エネルギー転移DNAハイブリダイゼーション \*

\* ヨンにおける標的濃度と蛍光放出の関係を示すグラフであり；  
第9図はフルオレセイン-dA<sub>3</sub>；dT<sub>2</sub>。-ビレンプローブを用いた競合的検定における各種標的DNAの濃度とフルオレセイン蛍光強度の関係を示すグラフであり；  
第10図は異なる濃度のフルオレセイン-dA<sub>3</sub>；dT<sub>2</sub>。-ビレンプローブを用いた競合的溶液ハイブリダイゼーションにおける標的DNA濃度と蛍光強度の関係を示すグラフであり；  
第11図はネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子を含むSP55プラスミドを検索するために、フルオレセイン-プラスミド-ビレンプローブを用いて行つた競合的ハイブリダイゼーションからのデータを示し；そして第12図は大腸菌エンテロトキシン遺伝子の競合的検定を示す。

【第1図】

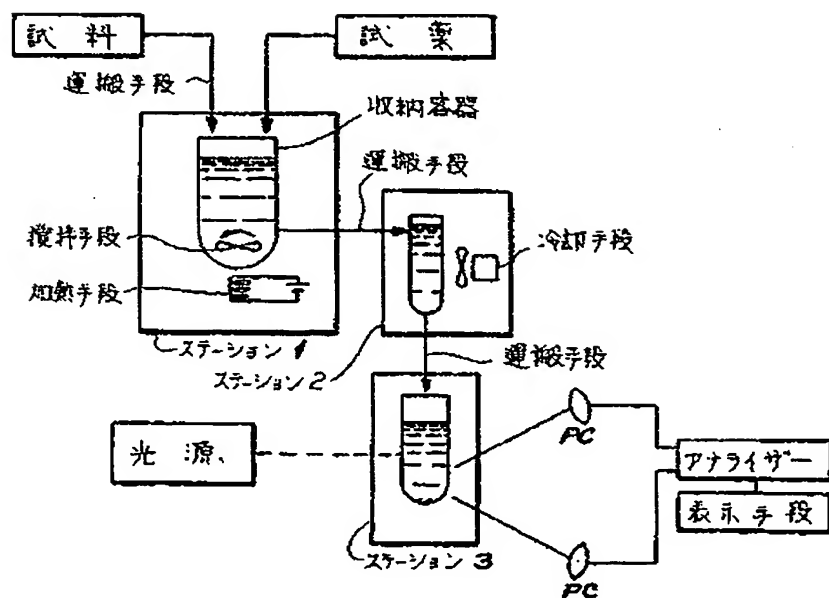
# 競合的 DNA 検定



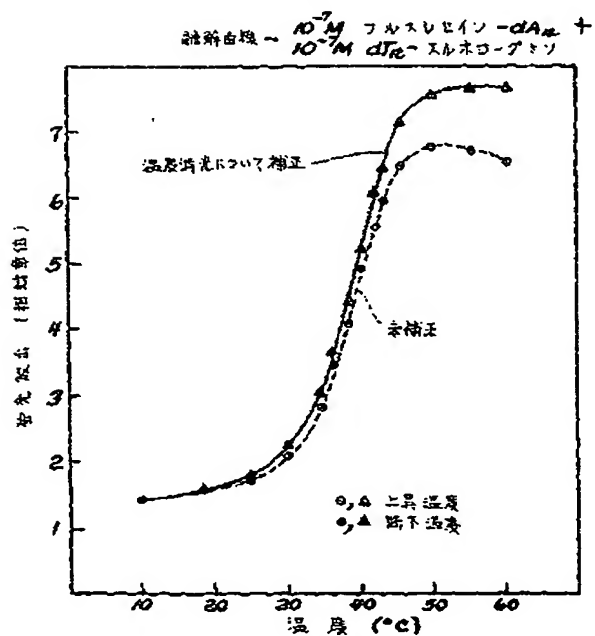
(19)

特許2619866

【第2図】



【第5図】

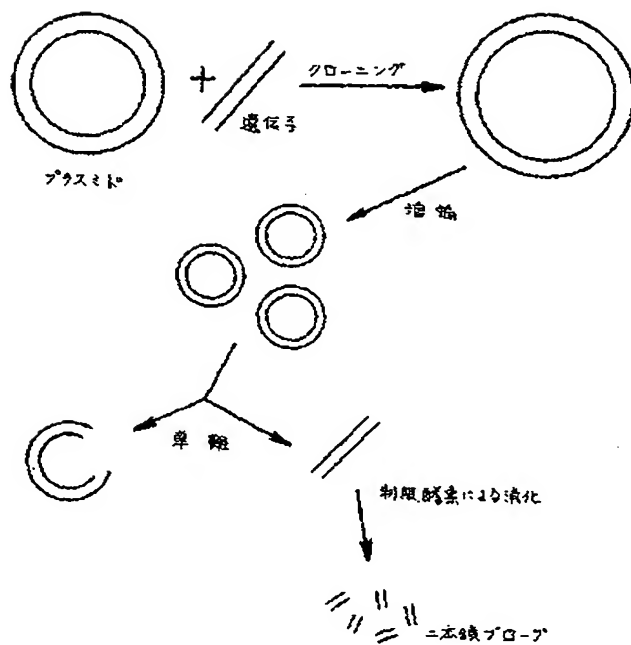


(20)

特許2619866

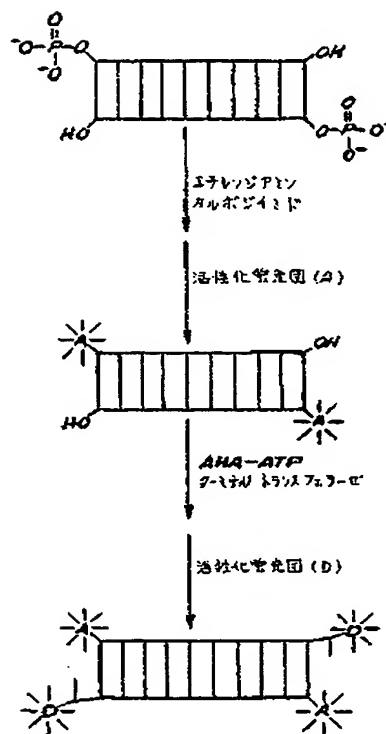
【第3図】

クローニング DNA 由来の二本鎖プロ-ア



【第4図】

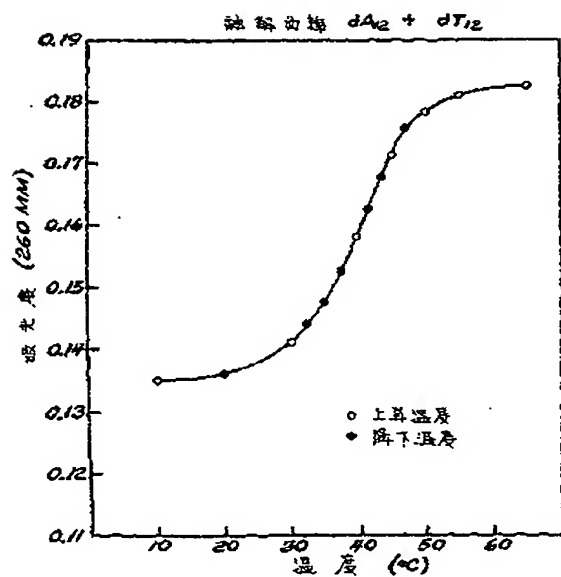
二本鎖プロ-アの末端修飾化



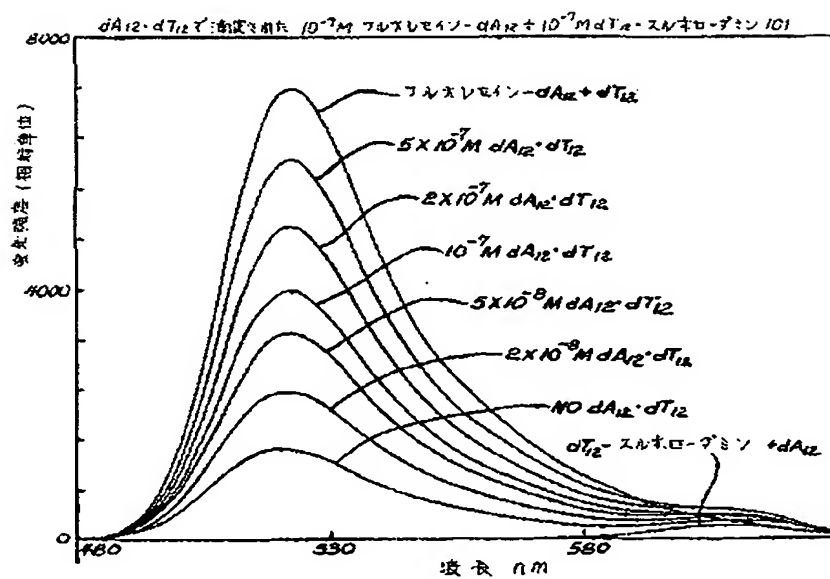
(21)

特許2619866

【第6図】



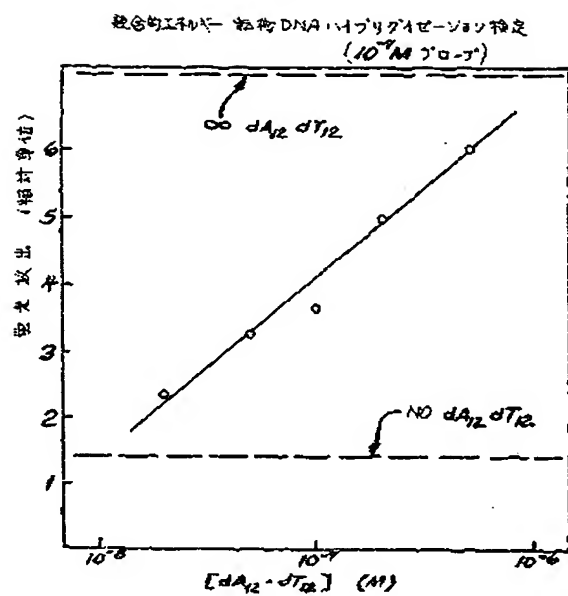
【第7図】



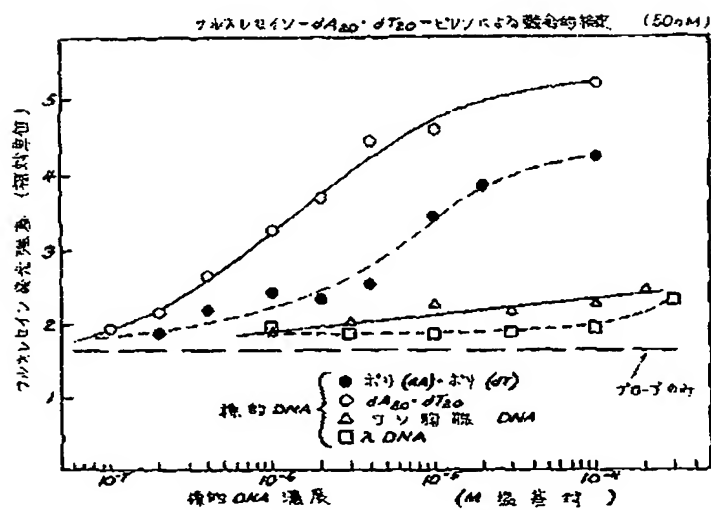
(22)

特許2619866

【第8図】



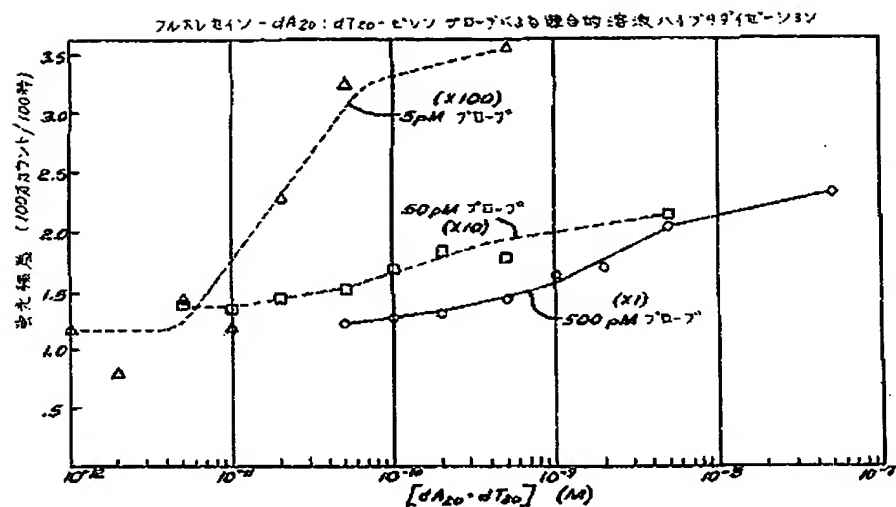
【第9図】



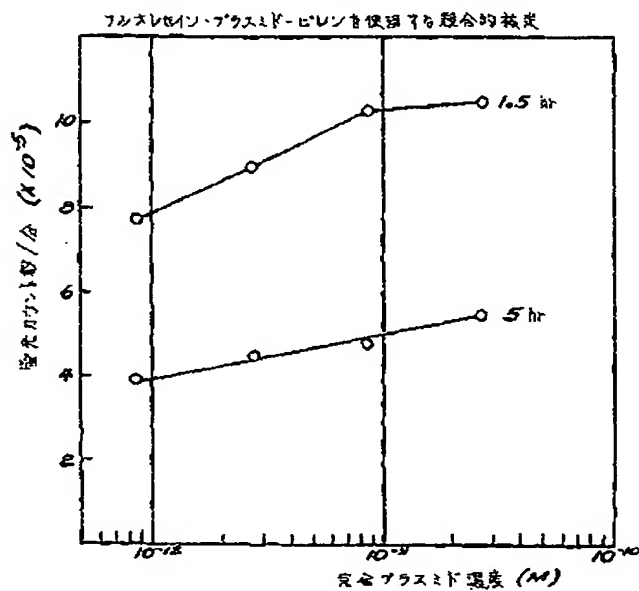
(23)

特許2619866

【第10図】



【第11図】





(24)

特許2619866

【第12図】

